



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/38, C07K 14/045, A61K 39/25	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/26074 (43) Date de publication internationale: 18 juin 1998 (18.06.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02285 (22) Date de dépôt international: 12 décembre 1997 (12.12.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/15344 13 décembre 1996 (13.12.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PRIEUR, Eric [FR/GB]; John Radcliffe Hospital, Institute of Molecular Medicine, Molecular Hematology Unit, Headley Way, Headington, Oxford OX3 9DS (GB). LULE, Jacqueline [FR/FR]; 16, rue Blaise Pascal, F-31830 Plaisance-du-Touch (FR). DAVIGNON, Jean-Luc [FR/FR]; 15, rue des Biches, F-31170 Tournefeuille (FR). DAVRINCHE, Christian [FR/FR]; 14, rue Charles de Gaulle, F-31700 Cornbarrieu (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, VZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: FUSION PROTEIN COMPRISING THE WHOLE OR PART OF THE PP65 PROTEIN OF HUMAN CMV, USEABLE IN PARTICULAR FOR PREPARING A VACCINE (54) Titre: PROTEINE DE FUSION COMPORTANT TOUT OU PARTIE DE LA PROTEINE PP65 DE CMV HUMAIN, UTILE NOTAMMENT DANS LA PREPARATION D'UN VACCIN (57) Abstract <p>The invention concerns a fusion protein characterised in that it comprises at least part of the pp65 protein of the cytomegalovirus (or CMV), or a protein having at least 80 % homology with the pp65 protein, in combination with at least a second peptide fragment derived from CMV. The invention also concerns a nucleotide sequence coding for such a protein, or a pharmaceutical composition containing them. It further concerns its use as medicine and a method for preparing the protein.</p> (57) Abrégé <p>Protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomégalo virus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins 80 % d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV. L'invention concerne également une séquence nucléotidique codant pour une telle protéine, ou une composition pharmaceutique les contenant. Elle se rapporte aussi à l'utilisation à titre de médicament et à un procédé de préparation de la protéine.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

PROTEINE DE FUSION COMPORTANT TOUT OU PARTIE DE LA
PROTEINE PP65 DE CMV HUMAIN, UTILE NOTAMMENT DANS LA
PREPARATION D'UN VACCIN.

La présente invention se rapporte à de nouvelles associations de
5 protéines, et à leur utilisation comme médicament. Plus
particulièrement, elle concerne la mise au point de vaccins contre le
CMV.

Le cytomégalovirus humain (CMV), un virus enveloppé à ADN
double brin de 230 kpb est le plus gros de la famille des Herpès virus.
10 Comme les autres membres de cette famille de virus, il est présent sous
forme latente et peut subir des réactivations répétées conduisant à une
virémie plusieurs années après l'infection initiale. Le CMV est largement
répandu à travers le monde et s'il est bien toléré par les individus sains,
il est associé à des pathologies aux conséquences souvent dramatiques
15 pour le fœtus et les immunodéprimés (greffés, sida, cancer) (pour revue
voir (1)).

A la suite d'une primo-infection en cours de grossesse, la
transmission verticale du virus au fœtus par voie trans placentaire est
source de complications chez le nouveau né. Ce sont en particulier des
20 troubles sensoriels (vision, audition) et des retards mentaux importants
survenant au cours des premières années de la vie. L'infection par le
CMV est associée au rejet du greffon chez les transplantés (allogreffes
de moelle, de rein, de cœur, de foie). Elle représente une des infections
opportunistes les plus dramatiques chez les individus HIV+ qui, malgré
25 une chimiothérapie par des antiviraux, sont victimes de pathologies
souvent mortelles. Pour toutes ces raisons l'infection par le CMV
soulève un problème de santé publique important.

L'utilisation d'antiviraux non spécifiques comme Ganciclovir* et
Foscarnet* pendant la greffe pose des problèmes de cytotoxicité. Les
30 effets secondaires imposent souvent la diminution des doses ou l'arrêt
du traitement, ce qui expose au risque de reprise des troubles associés

à l'infection virale. L'injection intraveineuse à haute dose d'immunoglobulines a permis dans certains cas une réduction de la fréquence des pneumopathies et des rejets. Des tentatives d'immunothérapie adoptive ont été développées en injectant à des
5 receveurs de moelle des clones de cellules T cytotoxiques spécifiques de CMV (2).

La mise au point d'un vaccin sous unitaire aurait une importance capitale pour les futures mères. En effet il a été montré que l'immunité maternelle acquise avant la conception pouvait protéger les nouveau-
10 nés contre les méfaits d'une infection congénitale (3). Le développement d'une immunité anti CMV chez les transplantés serait un facteur important contre le développement des maladies associées à l'infection. Des essais de vaccination avec du virus atténué de la souche de Towne ont été effectués et sont en cours chez des volontaires séronégatifs et
15 des greffés séronégatifs ayant reçu un greffon de donneurs séropositifs (4). Dans la majorité des cas, la vaccination a réduit la sévérité des maladies associées à la réplication du virus. Dans la mesure où l'activité pathogène de tels vaccins n'a pas été définitivement exclue, et où l'utilisation de vaccins vivants peut provoquer des réactions
20 secondaires graves chez des individus immunodéficients, de nouvelles approches utilisant des protéines virales recombinantes en présence d'adjuvants sont en cours de développement.

L'importance pour la santé publique du développement d'un vaccin anti CMV n'est plus à démontrer devant le problème posé par
25 l'infection congénitale jusque là sous estimée par la communauté médicale.

Les économies réalisées en élaborant une politique de prévention des maladies liées à l'infection par le CMV chez les individus à risque seraient substantielles. En effet, des estimations du coût associé à la
30 vaccination d'un individu et à sa prise en charge (analyses sérologiques,

vaccin, traitement d'effets secondaires mineurs) montrent qu'il serait environ 50 fois inférieur à celui des soins apportés à un nouveau né victime d'une infection congénitale. L'infection à CMV est observée chez les 2/3 des transplantés rénaux et à une fréquence élevée chez les autres transplantés. Si l'on considère que l'infection est associée à des complications chez environ 1/3 d'entre eux, le coût annuel ajouté à celui de la transplantation est considérable. Malgré l'impact de drogues comme le Ganciclovir*, l'injection de gammaglobulines ou le transfert de clones T anti CMV sur la maladie, la prévention de l'infection primaire et de la réactivation chez ces patients doit être une priorité. Les bénéfices de l'immunisation sont évidents autant sur le plan clinique qu'économique.

La Demanderesse a maintenant trouvé que l'association de la protéine pp65 du CMV, ou de l'un de ses fragments, avec un autre haptène ou antigène du CMV permet de potentialiser la réaction immunogène vis-à-vis de ce virus, notamment en stimulant les compartiments T CD4+ et CD8+ contre le virus.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomégalovirus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV.

La protéine pp65 est une protéine de matrice du CMV, qui est internalisée dans les cellules et délivrée dans le cytosol en même temps que le virion, très peu de temps après l'infection.

Elle peut être utilisée entière ou sous forme d'un ou plusieurs fragments ; les fragments peptidiques entrant dans la protéine chimère ont de préférence une longueur supérieure ou égale à 9 acides aminés, et couvrent différentes restrictions HLA de classe I. La Demanderesse a montré qu'un peptide de la protéine pp65 d'une longueur supérieure à

9 acides aminés peut être internalisé par une cellule présentatrice et présenté par une molécule du CMH de classe I à une lignée TCD8+ spécifique. L'intérêt de constructions incluant ces peptides et la protéine IE1 en vaccination serait lié à l'utilisation d'antigènes capables
5 d'entrer dans la cellule présentatrice par une voie unique d'endocytose et d'induire à la fois une réponse TCD4+ et TCD8+.

De préférence le second fragment peptidique présent dans la protéine de fusion est constitué par la protéine IE1 ou l'un de ses épitopes, ou par une protéine présentant au moins 80% d'homologie.

10 En effet, la séquence polypeptidique de IE1, protéine de régulation majeure du cycle viral est très conservée entre les différentes souches virales. L'introduction de cette protéine dans un vaccin sous unitaire permettrait l'induction de cellules TCD4+ auxiliaires mémoires capables de coopérer à l'induction de cellules TCD8+ cytotoxiques anti-pp65 et à
15 la production d'anticorps contre la protéine d'enveloppe gB, soumise à une plus grande variabilité ("cross help"). En effet, il a été montré que la majorité des anticorps neutralisants présents dans le sérum des individus infectés étaient dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe virale gB (UL55). Pour cette raison, la protéine gB a été considérée
20 comme un des antigènes viraux les plus importants pour la vaccination. De nombreux protocoles utilisant des virus recombinants (Adénovirus, Vaccine, Canaripox...) ont été développés (5, 6, 7).

Les problèmes posés par ces vaccins sont liés soit au caractère pathogène des virus vivants, soit au fait qu'ils induisent des taux
25 d'anticorps trop faibles. Une alternative est l'utilisation d'antigènes recombinants associés à des adjuvants. L'association de la glycoprotéine gB à la protéine chimère IE1-pp65 dans une structure permettant le maintien de sa conformation, indispensable à son immunogénicité, offrirait un moyen de stimuler les compartiments T et
30 B de la réponse anti virale. De plus, l'activation des cellules TCD4+ anti-IE1, médiée par la reconnaissance des peptides IE1 associés aux

molécules du CMH de classe II, pourrait permettre de contrôler la réplication du virus dans les cellules voisines soumises à l'effet de l'IFN γ et du TNF α (8). Ces hypothèses ne sont bien entendu aucunement destinées à limiter la portée de l'invention.

5 On peut notamment utiliser le fragment e4 de la protéine IE1 du CMV, ou un fragment peptidique présentant au moins 80% d'homologie avec ledit fragment e4. e4 ou exon 4, qui comprend 406 acides aminés est un fragment de la protéine IE1, qui comporte 491 acides aminés.

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, la protéine de fusion comprend a) le fragment délimité par les résidus d'acides aminés 162 et 175 de la séquence de la protéine IE1 ou,

b) un fragment peptidique présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment mentionné en a).

D'autres épitopes conviennent à la mise en oeuvre de l'invention, tels ceux mentionnés par Davignon et al (8).

La protéine de fusion selon l'invention peut contenir en outre un fragment peptidique dérivé d'un microorganisme différent du CMV, et/ou tout fragment polypeptidique permettant sa purification ultérieure du type des séquences "Tag"; ces séquences placées en amont ou en aval de la protéine d'intérêt permettent de la purifier ou de la marquer ; on peut citer à titre d'exemples l'utilisation de β -galactosidase, d'hexamères d'Histidine (His₆...), ou de GST. Selon un mode de réalisation préféré, la protéine de fusion comporte un fragment peptidique dérivé d'une enzyme à activité glutathion-S-transférase (ou GST).

La protéine GST facilitera notamment la purification de la protéine de fusion à partir d'un milieu de culture complexe.

L'invention a ainsi pour objet une protéine chimère GST-IE1-pp65 de 145 kDa, qui peut être produite dans E. coli. Son immunogénicité a été mise en évidence in vitro, par la prolifération de clones de cellules TCD4⁺ spécifiques de IE1 et par la lyse de cellules cibles incubées en

présence d'une lignée TCD8+ spécifiques de pp65. La Demanderesse a montré que la protéine sous forme soluble et ses fragments, permettaient de stimuler in vitro les compartiments TCD4+ et TCD8+ de la réponse cellulaire spécifique. Ces résultats font de cette protéine un réactif de choix pour la conception d'un vaccin sous unitaire.

Les séquences nucléotidiques codant pour une protéine de fusion telle que définie ci-dessus sont également comprises dans l'invention.

Les protéines de fusion et les séquences nucléotidiques correspondantes sont utiles à titre de médicament, et peuvent plus particulièrement être utilisées pour la préparation d'un vaccin destiné à prévenir les infections provoquées par le CMV. Un tel vaccin sera susceptible d'induire une réponse efficace contre une infection primaire avant que le virus ne se soit répliqué activement.

Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient

- a) au moins une partie de la protéine pp65 du CMV, ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV, ou
- b) des séquences nucléotidiques codant pour les peptides mentionnés en a).

Outre les excipients de formulation connus de l'homme du métier, tels que stabilisants, conservateurs, anti-oxydants, et adaptés à la voie d'administration, en particulier la voie injectable, les compositions pourront contenir des adjuvants d'immunité. Elles peuvent également contenir d'autres épitopes du CMV. Enfin elles peuvent être formulées avec des systèmes améliorant le transport et la présentation des molécules aux cellules cibles.

Les protéines pourront être sous forme de plusieurs protéines distinctes dans la composition ; elles pourront également être sous

forme d'une protéine de fusion telle que décrite précédemment ; il en est de même pour les séquences nucléotidiques correspondantes.

La composition peut contenir en outre d'autres épitopes en particulier des antigènes d'enveloppe du CMV, comme la protéine gB.

5 Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine de fusion, caractérisé en ce qu'on procède aux étapes suivantes :

- a) on lie une première séquence d'ADN codant pour au moins une partie de la protéine pp65 du CMV avec une seconde séquence d'ADN
10 codant pour un autre polypeptide ou protéine dérivé du CMV de manière à obtenir une séquence d'ADN recombinant codant pour une protéine de fusion,
- b) on introduit la séquence d'ADN recombinant dans une construction contenant les éléments nécessaires à son expression, et
15 éventuellement des séquences codant pour d'autres polypeptides,
- c) on introduit la construction obtenue en b) dans des cellules hôtes qui sont ensuite mises en culture dans des conditions dans lesquelles le système d'expression de l'ADN de fusion est fonctionnel, de manière à ce que la protéine de fusion soit produite dans la cellule hôte,
- 20 d) on récupère la protéine de fusion produite dans la cellule hôte et on la purifie.

La cellule hôte contenant une séquence nucléotidique codant pour une protéine de fusion, susceptible d'être obtenue dans le procédé décrit ci-dessus est également comprise dans l'invention. Cette cellule
25 hôte peut notamment être choisie dans le groupe constitué par les bactéries, les virus, les levures et les cellules d'eucaryotes, notamment d'eucaryotes supérieurs.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent.

30 Dans ces exemples on se référera aux figures qui suivent :

Figure 1 : Analyse en Western Blot de l'expression de la protéine GST-IE1-pp65.

Des lysats de bactéries transformées avec les plasmides pGEX 2TK (1) et pGEX 2TK/IE1-pp65 (2, 2') ont été soumis à une SDS-PAGE puis à Western Blot révélé par des anticorps anti-GST (A), anti-IE1 (B) et anti-pp65 (C). Des marqueurs de masses moléculaires (M) précolorés (Gibco) ont été utilisés.

Figure 2 : La protéine GST-IE1-pp65 induit une prolifération spécifique du clone TCD4+ BeA3G9 en présence de PBMC.

Les cellules du clone BeA3G9 ont été incubées en présence de PBMC irradiées de phénotype HLA-DR8 et d'antigène GST ou GST-IE1-pp65. La prolifération des cellules du clone a été déterminée par l'incorporation de [³H]-thymidine, mesurée en cpm.

Figure 3 : La lignée TCD8+ anti-pp65 <<Val>> lyse des cellules d'astrocytome U373MG infectées par CMV Towne.

La lignée TCD8+ <<Val>> générée avec le peptide N9V de pp65 a été utilisée dans un test de relargage de ⁵¹Cr en présence de cellules U373MG soit incubées avec le peptide N9V, soit avec le peptide I9Y, soit infectées par CMV Towne (5moi) pendant 4h puis incubation avec le peptide I9Y. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé comme indiqué dans Matériels et Méthodes.

Figure 4 : Représentation schématique des protéines recombinantes produites dans E. coli.

Les séquences peptidiques correspondant aux épitopes présentés par HLA-DR8, HLA-A2 et HLA-B35 et leurs localisations sont représentées.

Figure 5 : La lignée TCD8+ anti-pp65 <<Val>> lyse des cellules B/EBV incubées en présence de la protéine GST-IE1-pp65 prétraitée à la trypsine.

Les cellules de la lignée <<Val>> ont été utilisées dans un test de relargage de ^{51}Cr en présence de lymphocytes B/EBV autologues prétraités ou non avec la chloroquine (Matériels et Méthodes) et les peptides et protéines comme indiqué.

Figure 6 : Analyse de la production de la protéine His6-IE1-pp65 par des cellules d'insectes infectées par un Baculovirus recombinant.

Des cellules d'insectes Sf9 ont été infectées avec des Baculovirus recombinants IE1-pp65 pendant 48 h. Les lysats cellulaires (1) ont été centrifugés, le surnageant (2) passé sur une colonne Ni-Agarose et les éluats récupérés (3,4). Les différentes fractions ont été soumises à un SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

Figure 7 : Induction d'effecteurs TCD4+ anti-IE1 chez un donneur CMV+ avec la formulation BVSM/IE1-pp65.

Des PBMC d'un donneur CMV+ ont été stimulées avec la protéine IE1-pp65 (AG) soit soluble, soit formulée avec des BVSM (AG form) ou en absence d'antigène (Mock). A J35, les cellules sont incubées en présence de solutions protéiques contenant la protéine IE1 ou non (col). La prolifération des cellules T spécifiques anti-IE1 a été déterminée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.

Exemple 1: Production de la protéine de fusion dans des bactéries DH5 α

Matériels et Méthodes

I-Clonage des ADNc de IE1 et pp65 dans pGEX 2TK

I-1 Préparation des ADNc IE1 et pp65

5 I-1-1 ADNc-IE1

La région du génome viral contenant la séquence codant pour la protéine IE1 située dans le fragment C-Hind III de la souche CMV-Towne a été cloné dans un plasmide nommé pRL103. Ce plasmide a été utilisé pour transfecter des cellules de la lignée astrocytaire U373 MG (désignée A2 (don de R. Lafemina, Merck Sharp and Dohme, WestPoint, PA, USA). Ces cellules ont été cultivées dans du RPMI-SVF (RPMI 1640 Glutamax, 1 mM pyruvate de sodium, 200 u/ml penicilline, 100 µg/ml streptomycine, 10% sérum de veau décomplémenté) jusqu'à confluence. L'ARN total d'une culture de 3 jours a été préparé selon la technique de Chomzynski et Sacchi (14). L'ADNc de IE1 a été généré par RT-PCR (Kit Super Script, GIBCO BRL) sur un aliquot de-5 µg d'ARN total selon les indications du fournisseur avec les amorces C1: GATCCGGATCCATGGAGTCCTCTGCCAAGAGA et C2 : CCCGGGGGAATTCCTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT. Des sites BamHI et EcoRI ont été introduits dans les amorces C1 (extrémité 5' de IE1) et C2 (extrémité 3' de IE1) respectivement. Le produit de PCR ainsi obtenu (1480 pb) a été purifié sur colonne S400-HR (PHARMACIA).

I-1-2 ADNc-pp65

Les cellules d'une lignée fibroblastique humaine (MRC5, Mérieux) cultivées en BME supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (BME/SVF) ont été infectées par le CMV (souche Towne). Dès l'apparition d'un effet cytopathique, le surnageant contenant le virus a été récupéré et inactivé par la chaleur (60°C, 30 mn). Les particules virales ont été récoltées par centrifugation (31000g, 4°C, 90 mn) et les capsides ont été dégradées par un traitement avec la protéinase K

(BOEHRINGER) (150 µg) dans 250 µl de tampon de lyse (10 mM TrisCl pH 7.5, 1mM EDTA, 2% sarcosyl) pendant 30 mn à température ambiante. L'ADN viral a été extrait au phénol/chloroforme puis précipité par l'éthanol absolu. Le culot d'ADN a été séché et solubilisé dans 20 µl d'eau. Un fragment correspondant à l'ADNc de pp65 a été obtenu par PCR sur un aliquot de 2 µl d'ADN viral en utilisant les amorces C3: CCCGGGGAATTCATGGCATCCGTACTGGGTCCC et C4: GAATTCGGATCCTCAACCTCGGTGCTrmGG complémentaires des extrémités 5' et 3' du gène de pp65 et contenant respectivement les sites EcoRI et BamHI. Le produit de PCR (1670 pb) a été purifié sur colonne S400-HR (PHARMACIA).

I-2 Construction du plasmide pGEX 2TK-IE1-pp65

15 1-2-1 Purification des fragments IE1 et pp65 digérés par Bam H1 et Eco R1

Les fragments d'ADNc de IE1 et pp65 ont été préalablement clonés dans les sites BamH1 et EcoRI d'un plasmide pUC18. Des bactéries compétentes DH5α (GIBCO) ont été transformées par 5 à 10 ng de ligation IE1/pUC18 ou pp65/pUC18. Les plasmides recombinants ont été digérés par BamH1 et EcoRI. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et extraits du gel avec le kit "JetSorb/150" (GENOMED).

25 I-2-2 Purification du fragment IE1-pp65

Une quantité identique des fragments IE1 et pp65 digérés par BamH1 et EcoRI a été incubée en présence de T4 DNA Ligase. Le mélange réactionnel a été soumis à une digestion par BamH1. Les fragments obtenus pp65-pp65 (3340 pb), IE1-pp65 (3150 pb) IE1-IE1 (2960 pb) ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le

fragment IE1-pp65 a été extrait du gel avec le kit "JetSorb/150" (GENOMED).

1-2-3 Clonage de IE1-pp65 dans pGEX 2TK

5 Le fragment IE1-pp65 a été inséré dans le site BamH1 du plasmide pGEX 2TK (PHARMACIA). Les clones de bactéries recombinantes ont été conservés à -80°C dans du PBS, 3.5% DMSO jusqu'à leur utilisation pour la purification de la protéine.

10 II-Production de la protéine de fusion GST-IE1-pp65

Un aliquot de bactéries congelées à -80°C a été remis en suspension dans 5ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (Ap, 50 µg/ml) et mis en culture pendant 8 heures à 37°C. La culture, diluée dans 45 ml du même milieu a été poursuivie pendant 15 heures, reprise dans 500 ml de LB+Ap jusqu'à une densité optique ($\lambda=600$ nm) de 1. La production de GST-IE1-pp65 a été induite par l'ajout d'IPTG (100 µM) dans le milieu de culture. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation après 3 heures de culture à température ambiante et conservées à - 80°C.

20 La lyse des bactéries et la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur une colonne "Sepharose 4-B" greffée avec du Glutathion (PHARMACIA) ont été effectués selon les indications du fournisseur.

Le degré de pureté de la protéine a été contrôlé en SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. L'antigénicité de GST-IE1-pp65 a été analysée en western-blot en utilisant des anticorps de chèvre dirigés contre GST (PHARMACIA, dilution 1/400), et des anticorps de souris dirigés contre IE1 (surnageant E13 dilué au 1/10, don du Dr.Mazeron, Hal Lariboisière, Paris) et pp65 (NEA 20 dilué au 1/250, DUPONT). Des anticorps secondaires couplés à la peroxydase RAG/PO, RAM/PO (Nordic) ont été utilisés au 1/500. Les protéines ont été dosées

selon la méthode de Bradford avec le kit "Bio-Rad Protein Assay" (BIORAD). La protéine recombinante GST a été produite et purifiée.

Résultats et discussion

5

Purification de GST-IE1-pp65

Nous avons obtenu en moyenne 1 mg de protéine GST-IE1-pp65 purifiée par chromatographie-glutathion à partir d'une culture de 500 ml de DH5 α /pGEX 2TK-IE1-pp65. L'analyse en électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un western blot avec les anticorps anti-GST, anti-IE1 et anti-pp65 effectuée à partir de lysats de bactéries recombinantes est montrée sur la figure 1. Un produit correspondant à une masse théorique de 145 kDa était révélé par les trois anticorps dans les échantillons préparés à partir des bactéries recombinantes. Les bandes de masses moléculaires inférieures reconnues par les anticorps sont des produits de dégradation de la protéine. Ces résultats sont en accord avec la production dans ces bactéries d'une protéine résultant de la fusion GST-IE1-pp65 (Figure 4). La protéolyse de la protéine par la trypsine a été analysée en SDS-PAGE et montre la disparition de la bande de migration correspondant à la protéine entière corrélée avec l'apparition d'une bande de faible poids moléculaire correspondant à la génération de peptides. Parmi ces fragments, et d'après l'analyse de la séquence de la protéine figure un peptide de 15 aa contenant le peptide N9V (voir "Matériels et Méthodes" et Figure 4).

25

Exemple 2

Matériels et méthodes

30 I-Test de lymphoprolifération

Des cellules (2×10^4) d'un clone T CD4⁺ (BeA3G9) restreint par HLA DR8 et spécifique d'un épitope situé à la position 162-175 de la protéine IE1 ont été incubées dans 100 μ l de milieu RPMI-SH avec des cellules présentatrices d'antigène (1×10^5 PBMC) irradiées (2500 rads) de même phénotype HLA-DR. Ces cellules ont été incubées avec une gamme de dilution de la protéine recombinante. Au jour 3, 1 μ Ci de [³H]-thymidine (AMERSHAM) par puits a été ajouté à la culture. Quinze heures plus tard, l'ADN cellulaire a été recueilli sur des filtres en fibre de verre (PACKARD) et l'incorporation de [³H]-thymidine mesurée dans un compteur β à gaz Matrix 9600 (PACKARD). Chaque mesure a été réalisée en triple.

II-Génération d'une lignée T CD8⁺ spécifique d'un peptide de la protéine pp65

Des leucocytes du sang périphérique de donneurs séropositifs pour le CMV (2×10^6 /ml) d'haplotype HLA-A2 ont été mis en culture dans des plaques 24 puits en RPMI-SH (2 ml). 100 U/ml de "Lymphocult-T-LF" (BIOTEST, France) ont été ajoutés à J+3. A J+7, les cellules vivantes ont été récupérées dans l'anneau d'un gradient de ficoll. Ces cellules (5×10^5 /puits) ont été incubées en présence de cellules stimulatrices autologues (1.5×10^6 /puits) en RPMI-SH (2 ml) supplémenté par 10% de «Lymphocult». Les cellules stimulatrices (10×10^6 cellules/ml) ont été incubées dans du RPMI en présence de 30 μ g d'un peptide présenté par HLA-A2 (peptide N9V, Figure 5, Néosystem, France) pendant 1 heure à 37°C et ont été irradiées (2500 rads). Les cellules effectrices ont été restimulées dans les mêmes conditions tous les 7 jours. La cytotoxicité de la lignée «Val» ainsi obtenue a été testée au jour 14. Le phénotype CD8⁺ de la lignée a été déterminé par cytofluorimétrie avec l'anticorps monoclonal de souris OKT8.

III-Test de cytotoxicité

III-1 Dans le contexte de l'infection par le CMV

Des cellules d'astrocytome U373MG d'haplotype HLA-A2 (2×10^5) à 80% de confluence en RPMI/SVF ont été infectées par le virus CMV-Towne à raison de 5pfu/cellule dans des plaques à 6 puits (10 cm²).
Après 4h d'infection les cellules ont été marquées avec 100 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (ICN, France) et lavées en RPMI. Les cellules effectrices autologues de la lignée TCD8+ ont été incubées avec 10⁴ cellules cibles dans du RPMI/10% SVF (500 µl) pendant 4 heures à 37°C. Des quantités variables de cellules effectrices ont été ajoutées aux cibles de façon à obtenir différents rapports effecteur/cible. Alternativement, les cellules ont été préincubées toute la nuit à 37°C avec soit le peptide N9V soit un peptide reconnu par HLA-B35 (peptide I9Y, Figure 4, Néosystem, France) à une concentration finale de 100nM.

Le taux de relarguage spontané a été déterminé par la mesure de la radioactivité libérée par des cellules cibles maintenues en culture pendant 4 heures. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé en utilisant la formule suivante $[(\text{radioactivité mesurée} - \text{relarguage spontané}) / (\text{radioactivité totale} - \text{relarguage spontané})] \times 100$. La radioactivité est mesurée sur un compteur γ Cobra (PACKARD). Chaque mesure est réalisée en double.

III-2 En présence de la protéine GST-IE1-pp65 native ou digérée par la trypsine, avec ou sans chloroquine

La protéine purifiée GST-IE1-pp65 a été désalée par ultrafiltration centrifuge avec des unités de filtration "Centricon 10" (FILTRON), lyophilisée et reprise dans l'eau avant d'être utilisée sous cette forme ou digérée par la trypsine (TCPK, SIGMA, 200 ng pour 900 µg de protéine) dans un volume de 100 µl de tampon Tris [100 mM tris-HCl pH 8.0] pendant 2 heures à 37°C. Des aliquots prélevés avant et après digestion ont été analysés en SDS-PAGE.

Des lymphocytes B-EBV autologues (1×10^6) préalablement lavés et irradiés (104 rads) ont été préincubés soit avec les antigènes (1 μ M) pendant 15 heures à 37°C en milieu RPMI-SVF (0.5 ml) en plaque 48 puits soit dans du RPMI-SVF 5% / chloroquine 80 μ M (SIGMA) pendant 5 30 mn avant l'ajout des antigènes. Alternativement, les cellules ont été préincubées toute la nuit à 37° C avec soit le peptide N9V soit le peptide I9Y à une concentration finale de 10 nM. Au terme de cette incubation, les cellules (50000/ml) ont été marquées avec 100 μ Ci de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ et lavées en RPMI. Les cellules effectrices de la lignée TCD8+ ont été 10 ajoutées dans les mêmes conditions que pour les cellules d'astrocytomes.

15 Résultats et discussion

I-Lymphoprolifération du clone T CD4+ BeA3G9 en présence de GSTIE1-pp65

La figure 2 montre les résultats de la prolifération du clone 20 BeA3G9 anti-IE1 en présence de PBMC incubées avec l'antigène recombinant purifié GST-IE1-pp65. Le clone proliférait spécifiquement puisque en présence de la protéine GST aucune incorporation de thymidine n'avait été observée. Cette prolifération était du même ordre que celle obtenue avec la protéine de fusion GST-e4 (80% C-terminal 25 d'IE1) ou GST-IE1. Ces résultats montrent que la protéine GST-IE1-pp65 a été correctement apprêtée par les cellules présentatrices d'antigène HLA-DR8 de manière à présenter un épitope de IE1 reconnu par les cellules du clone BeA3G9.

II-Les cellules TCD8+ anti-pp65 de la lignée «Val» lysent des cibles incubées en présence de la protéine GST-IE1-pp65 dirigée par la trypsine

5 **II-1 La lignée «Val» reconnaît un peptide naturel généré après infection par le CMV**

La figure 3 montre les résultats d'un test de cytotoxicité effectué dans le contexte de l'infection de cellules d'astrocytome U373MG de phénotype HLA-A2. Une lyse spécifique des cibles a été observée en
10 présence du peptide N9V (HLA-A2) alors qu'elle est pratiquement nulle avec le peptide I9Y (HLA-B35), ce qui montre que les molécules du CMH de classe I de phénotype A2 à la surface des cellules U373MG sont chargées spécifiquement avec le peptide N9V. Lorsque ces cellules ont été infectées par le CMV, une lyse spécifique d'un niveau équivalent à
15 celui obtenu avec le peptide N9V était observée. Ceci suggère que la protéine pp65 apportée par l'inoculum a été délivrée dans le cytosol et apprêtée de telle sorte qu'un peptide identique ou de structure proche de N9V a été généré et présenté spécifiquement aux cellules de la lignée «Val».

20

II-2 Des lymphocytes B/EBV incubés en présence de la protéine GST-IE1-pp65 digérée par la trypsine sont lysés par la lignée anti-pp65 «Val» : effet du traitement des cellules à la chloroquine

Les résultats d'une expérience dans laquelle la protéine GST-IE1-
25 pp65 ne sensibilisait pas les cibles à la lyse par la lignée «Val» contrairement à un échantillon de cette même fraction prédigéré par la trypsine sont montrés sur la figure 5. Lorsque les cellules étaient prétraitées à la chloroquine et incubées en présence de la protéine digérée par la trypsine les cibles n'étaient pas lysées. Une digestion de
30 la protéine par la trypsine génère un peptide de 15 aa, N15K, contenant le peptide N9V (Figure 4). La mise en évidence d'une lyse des cibles en

présence de cet hydrolysate suggère que le peptide N15K est présenté à la lignée «Val». De plus, le prétraitement des cellules à la chloroquine montre que ce peptide a été internalisé par les cellules et apprêté dans un compartiment de type endo-lysosome sensible à une augmentation de pH.

Exemple 3

Matériels et méthodes

10

Clonage de IE1-pp65 dans le vecteur d'expression "Baculovirus" pAcHLT-B. Cotransfection de cellules d'insectes Sf9 avec le plasmide recombinant et l'ADN de Baculovirus:

Le fragment IE1-pp65 purifié (exemple 1, §1-2-2) a été inséré au site BglII du plasmide pAcHLT-B (PharMingen) contenant une séquence codant pour un peptide de 6 résidus histidine (His₆). Les plasmides recombinants ont été caractérisés et purifiés. Des cellules d'insectes Sf9 (ATCC CRL1711) ont été incubées pendant 4h à 37° C en présence d'un mélange contenant 3 µg de plasmide et 0,5 µg d'ADN viral selon le protocole proposé par PharMingen. Après 5 jours de culture la production de protéine a été analysée par "Western blot" avec les anticorps monoclonaux anti-IE1 (E13, Argene) et anti-pp65 (NEA20, Biosoft).

25 **Production et purification de la protéine His6IE1-pp65**

Une cinétique de production de la protéine dans des cellules Sf9 infectées a été réalisée de 0 à 5 jours et analysée en "Western blot". Des lysats de cellules infectées (Tampon de lyse: Tris 10 mM, NaCl 130mM, Triton X-100, NaF 10mM, NaPi 10mM, NaPPi 10mM, pH 7,5, PharMingen) ont été déposés sur une colonne d'affinité Ni-NTA (Qiagen) et la protéine éluée avec le tampon (NaPO₄ 50mM, NaCl 300mM,

30

Glycérol 10%, Imidazol 0,5M, Pharmingen). Le degré de pureté de la protéine a été contrôlé en SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

5 Résultats

Purification de la protéine His6IE1-pp65

La figure 6 montre l'analyse en SDS-PAGE de la protéine His₆IE1-pp65 produite par les cellules infectées avec des Baculovirus recombinants et purifiée par chromatographie Ni. Ces résultats
10 montrent que la protéine représente une part importante des protéines cellulaires totales et est obtenue avec un degré de pureté élevé après chromatographie.

15 Exemple 4

Matériels et méthodes

Induction de lignées TCD4+ in vitro à partir de PBMC d'un donneur CMV+, incubées en présence de la protéine chimère IE1-pp65 soluble ou formulée dans des BVSM (Biovecteurs supramoléculaires).
20

Les formulations IE1-pp65 ont été obtenues par coincubation pendant 1 heure à température ambiante, de la solution protéique
25 (200nM en PBS au 2,5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 62 mM NaCl, 0,65 mM KCl + 10% glycérol) et du BVSM de type L à (1mg/ml en eau distillée) dans un rapport massique protéine/biovecteur de 7,7 et protéine/noyau de 10. Le BVSM de type L, décrit dans WO 94/20078, comporte une double couche externe constituée par du
30 DPPC/cholestérol. Des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) d'un donneur CMV + d'haplotype DR3,13 ("Val") ont été

incubées dans des plaques 24 puits (Falcon) à raison de 4×10^6 cellules dans 2 ml de milieu RPMI/10% sérum humain (SH). L'antigène IE1-pp65 soluble ou formulé a été ajouté et l'incubation poursuivie pendant 3 jours à 37°C. A J3 on remplace 1 ml de milieu de culture par 1 ml de milieu neuf supplémenté par 10% de Lymphocult (100 u/ml, Biotest, France). Au 7^e jour les cellules effectrices sont stimulées par incubation avec des PBMC autologues (à raison de 1.5×10^6 PBMC pour 0.5×10^6 cellules) préalablement incubées (15h) en présence soit de l'antigène soluble soit de l'antigène formulé soit en l'absence de protéine. A J35 on réalise un test de prolifération dans les conditions décrites dans l'exemple 2, section Matériels et méthodes, "Test de lymphoprolifération", avec les modifications suivantes:

2×10^4 cellules effectrices sont incubées en présence de 1×10^5 PBMC allogéniques et d'une solution de protéines provenant du lysat de cellules d'astrocytomes U373MG transfectées par les gènes IE (appelées A2) et contenant l'antigène IE1. Un lysat de cellules non transfectées (appelé A0) a été utilisé comme contrôle négatif.

Résultats

20 Induction d'effecteurs TCD4+ anti-IE1 chez un donneur CMV+, à partir de formulations IE1-pp65.

La figure 7 montre la prolifération d'effecteurs anti-IE1 générés à partir de PBMC du donneur "Val" dans le seul cas où les effecteurs ont été induits en présence de l'antigène formulé. Ce résultat souligne l'effet potentialisateur de la formulation comme cela avait été montré précédemment par Prieur et al (9). Ces résultats suggèrent que dans des conditions où la fréquence de précurseurs TCD4+ anti-IE1 est faible comme c'est probablement le cas chez le donneur "Val" au moment du prélèvement la formulation permet de stimuler et d'expandre des cellules qui ne le sont pas lorsque l'antigène soluble est utilisé. L'intérêt de l'utilisation de ces formulations pour l'induction d'effecteurs T in

vitro est évident pour la mise au point de protocoles de transfert chez des greffés de moelle par exemple.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 2

5

—■— GST

—○— GST-IE1-pp65

Figure 3

10

□ N9V

▨ CMV 4h

□ I9Y

Figure 5

15

—■— I9Y

—□— N9V

—◆— N9V Chloroquine

—○— GST-IE1-pp65

—◆— GST-IE1-pp65 digérée

20

—○— GST-IE1-pp65 digérée Chloroquine

Figure 7

□ IE1
■ Col

REFERENCES

1. Alford C.A., and Britt W.J. (1990) Cytomegalovirus. In: Virology,
5 Second Edition, (ed. B. N.Fields, and D.M. Knipe et al.), Raven Press
Ltd., New York.
2. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, R. C., Agha,
M.E., Greenberg, P.D. (1992) Restoration of viral immunity in
10 immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.
Sciences 257: 238-241.
3. Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., Alford,
C.A. (1992) The outcome of congenital cytomegalovirus infection in
15 relation to maternal antibody status. N Engl J Med 326: 663-66.
4. Plotkin, S., Higgins, R., Kurtz, J.B., Morris, P.J., Campbell, D.A.,
Shope, T.C., Spector, S.A., and Dankner, W.M. (1994) Multicenter trial
of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal
20 transplant recipients. Transplantation 58: 1176-1178.
5. Cranage, M.P., Kouzarides, T., Bankier, A., Satchxell, S.; Weston,
K., Tomlinson, P and Barrell, B. Identification of the hyman
Cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing
25 antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. EMBO J.
1986, 5: 3057-3063.
6. Marshall, G.S., Ricciardi, R.P., Rando, R.F., Puck, J., Ge, R.,
Plotkin, S.A., and Genezol, E. An adenovirus recombinant that express
30 the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein and induces
neutralizing antibodies. J. Infect. Dis. 1990, 162 : 1177-1181.

7. Gonczol, E; Berencsi, K., Pincus, S., Endresz; V., Méric, C., Paoletti E., and Plotkin, S. Preclinical evaluation of an ALVAC (canarypox)-human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate. Vaccine. 1995, 13 : 1080-1085.

5

8. Davignon J-L, Castanié P., Allan-Yorke J., Gautier N., Clément D., Davrinche C. (1995) Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. J. Virol 70, 2162-2169 (1996).

10

9. Prieur E, Betbeder D, Niedergang F, Major M, Alcover A, Davignon J-L, Davrinche C. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T cell clones in vitro. Vaccine, 1996, 14: 511-520.

15

REVENDICATIONS

- 5 1. Protéine de fusion, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une partie de la protéine pp65 du cytomégalo virus (ou CMV), ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV.
- 10 2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le second fragment peptidique est constitué par la protéine IE1 ou l'un de ses épitopes, ou par une protéine présentant au moins 80% d'homologie.
3. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le second fragment peptidique est le fragment e4 de la protéine IE1 du CMV, ou un fragment peptidique présentant au moins 80% d'homologie avec ledit fragment e4.
- 15 4. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le second fragment peptidique est :
- 20 a) le fragment délimité par les résidus d'acides-amino 162 et 175 de la séquence de la protéine IE1 ou,
- b) un fragment peptidique présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment mentionné en a).
5. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un fragment peptidique dérivé d'un microorganisme différent du CMV.
- 25 6. Protéine de fusion selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comporte un fragment peptidique dérivé d'une enzyme à activité glutathion-S-transférase (ou GST) ou toute autre séquence "Tag".
- 30 7. Séquence nucléotidique codant pour une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6.

8. A titre de médicament, protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6, ou séquence nucléotidique selon la revendication 7.

9. Utilisation d'une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6 ou d'une séquence nucléotidique selon la revendication 7 pour la préparation d'un vaccin destiné à prévenir les infections provoquées par le CMV.

10. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient

10 a) au moins une partie de la protéine pp65 du CMV, ou d'une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine pp65, en association avec au moins un second fragment peptidique dérivé du CMV, ou

15 b) des séquences nucléotidiques codant pour les peptides mentionnés en a).

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle contient une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6 ou une séquence nucléotidique selon la revendication 7, avec des excipients pharmaceutiquement acceptables.

20 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un antigène d'enveloppe du CMV.

13. Procédé de préparation d'une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on procède aux étapes suivantes :

25 a) on lie une première séquence d'ADN codant pour au moins une partie de la protéine pp65 du CMV avec une seconde séquence d'ADN codant pour un autre polypeptide dérivé du CMV de manière à obtenir une séquence d'ADN recombinant codant pour une protéine de fusion,

30 b) on introduit la séquence d'ADN recombinant dans une construction contenant les éléments nécessaires à son expression, et

éventuellement des séquences codant pour d'autres polypeptides, notamment "Tag",

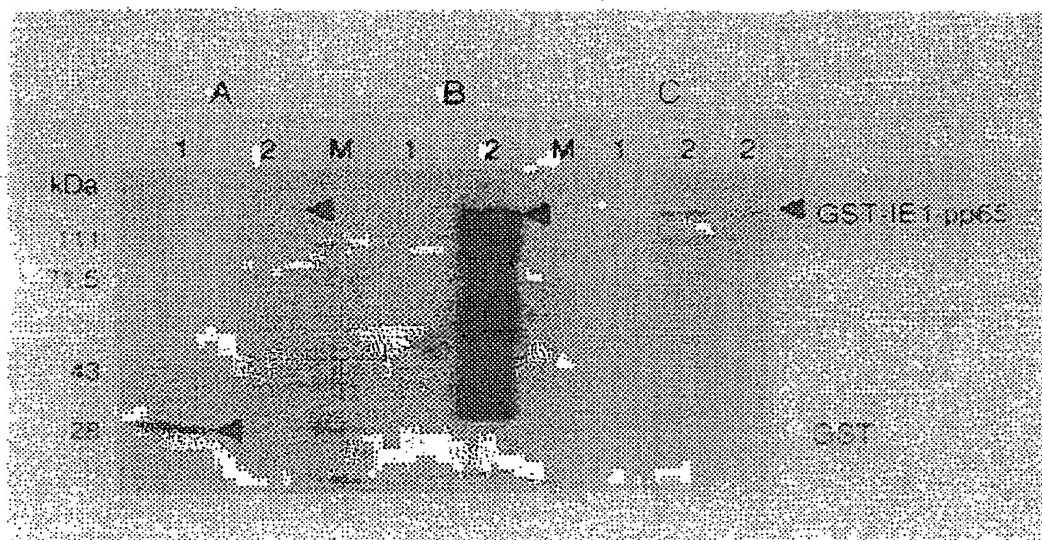
c) on introduit la construction obtenue en b) dans des cellules hôtes qui sont ensuite mises en culture dans des conditions dans lesquelles le système d'expression de l'ADN de fusion est fonctionnel, de manière à
5 ce que la protéine de fusion soit produite dans la cellule hôte,

d) on récupère la protéine de fusion produite dans la cellule hôte et on la purifie.

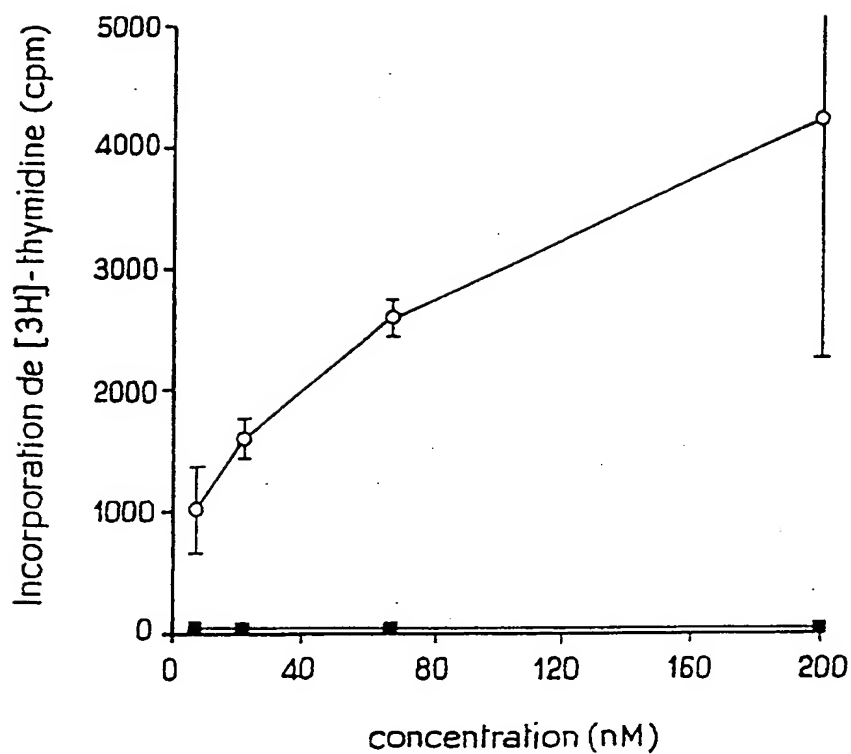
14. Cellule hôte contenant une séquence nucléotidique codant
10 pour une protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 6, susceptible d'être obtenue dans le procédé selon la revendication 13.

15. Cellule hôte selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par les bactéries, les virus, les levures et les cellules d'eucaryotes.

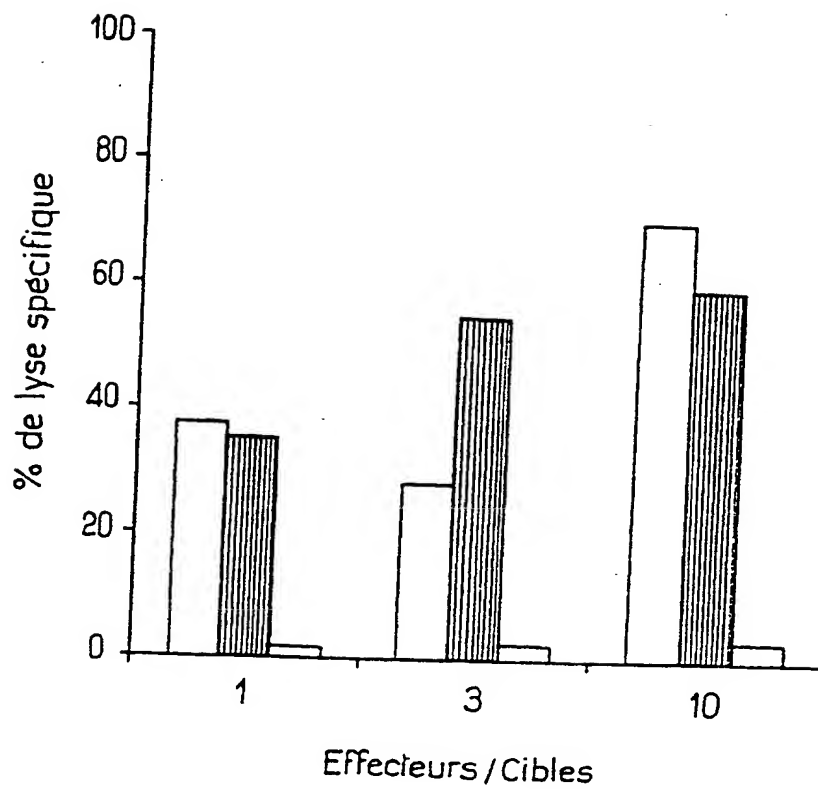
1/7

FIG.1

2/7

FIG. 2

3/7

FIG. 3

4 / 7

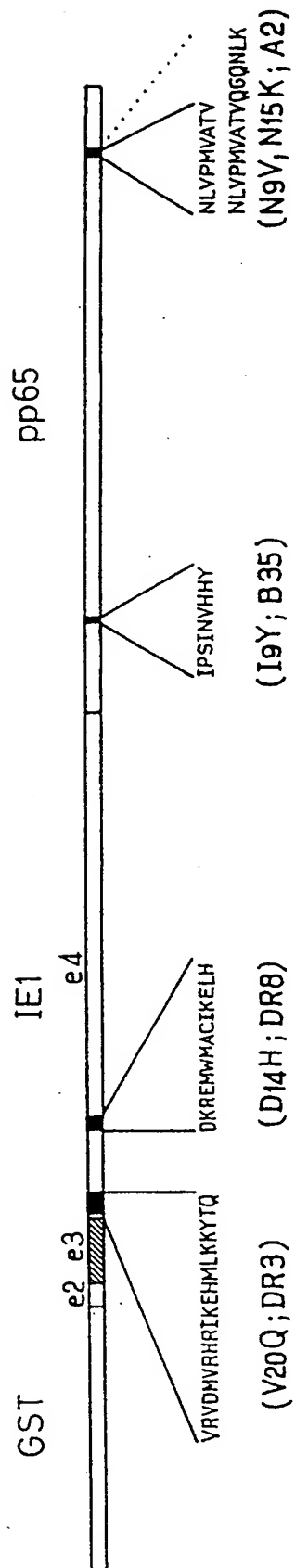
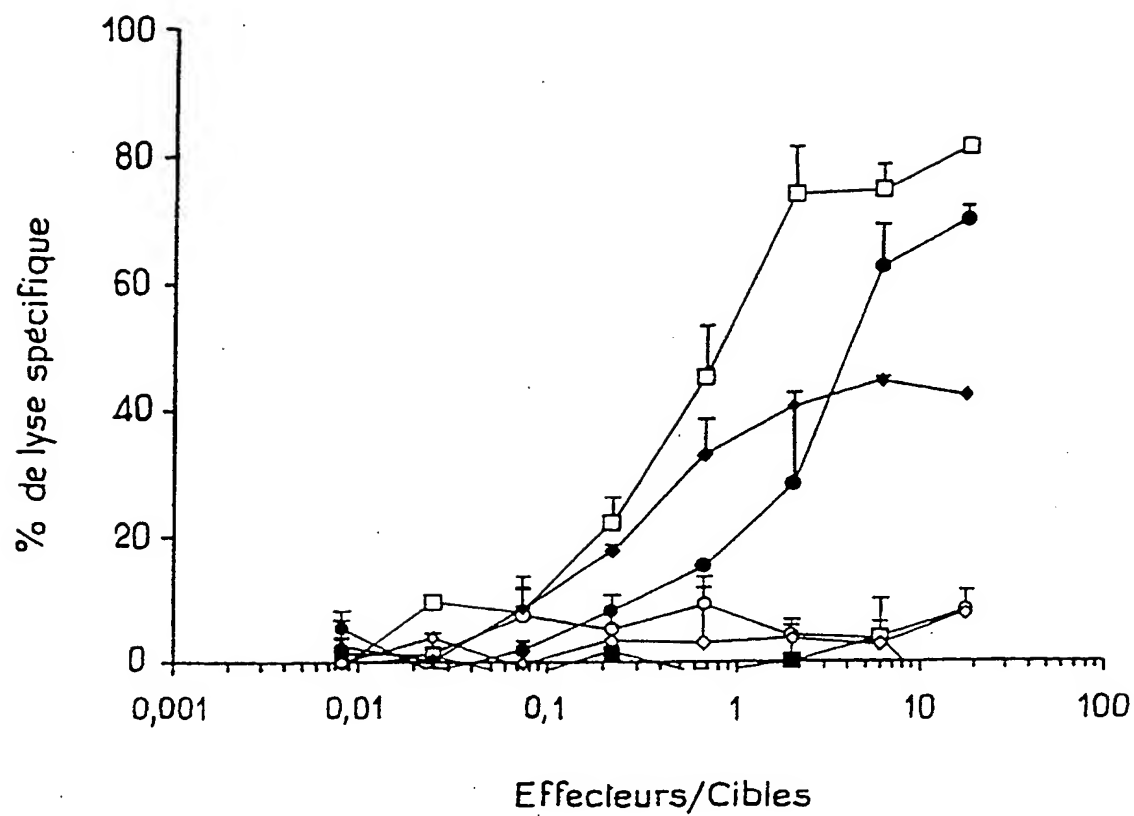


FIG. 4

5/7

FIG. 5

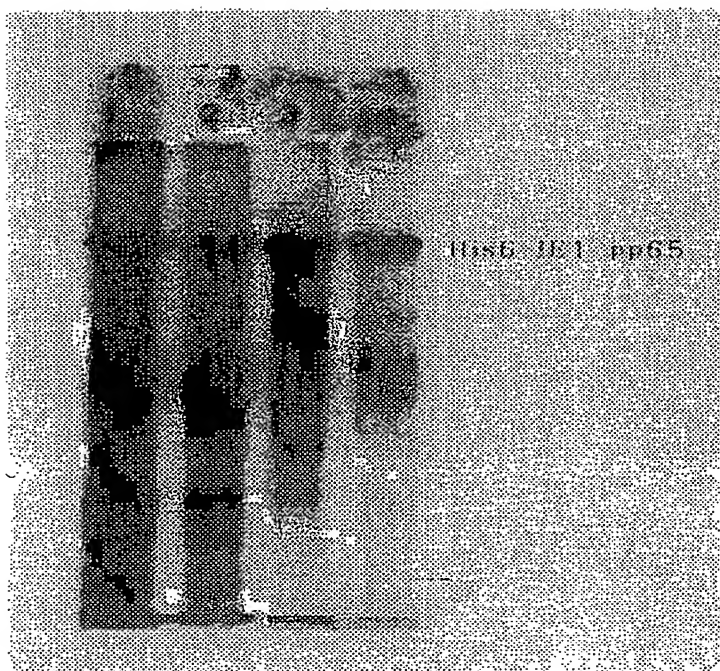


FIG. 6

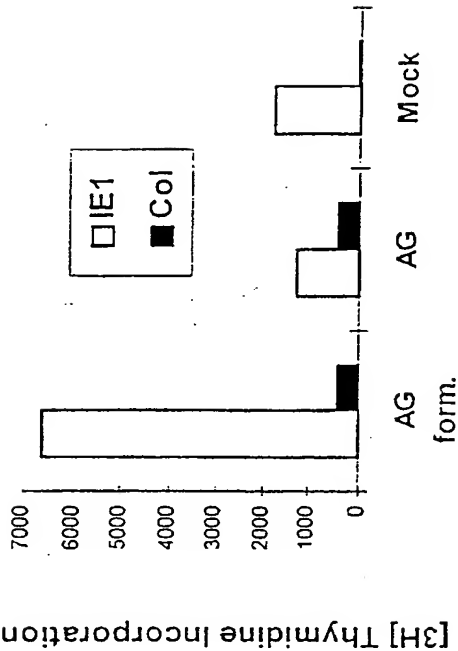


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/02285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/38 C07K14/045 A61K39/25

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 39491 A (VIROGENETICS CORP) 12 December 1996 see page 141, paragraph 4 - page 149, paragraph 1 see page 171, paragraph 4 - paragraph 5; claims	1-4, 7, 9, 13-15
X	DE 44 26 453 C (BIOTEST AG) 2 November 1995 see column 2, line 7 - line 28; claims; examples	1, 7, 13-15
A	WO 94 00150 A (HOPE CITY ; PANDE HEMA (US); RIGGS ARTHUR D (US); ZAIA JOHN A (US)) 6 January 1994 see claims; examples	1, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May 1998

Date of mailing of the international search report

20/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02285

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 06638 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS SA ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); BETBEDER) 7 March 1996 see claims; examples ---	1,2,6,9
A	WO 96 01321 A (ABBOTT LAB ;LANDINI MARIA PAOLA (IT); RIPALTI ALESSANDRO (IT); MAI) 18 January 1996 see claims; examples ---	1
P,A	WO 97 31117 A (UNIVERSITEIT MAASTRICHT ;BRUGGEMAN CATHARINA ANNA (BE); VINK CORNE) 28 August 1997 see claims; examples -----	1,7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02285

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639491	A	12-12-1996	AU 6160196 A EP 0837928 A	24-12-1996 29-04-1998
DE 4426453	C	02-11-1995	EP 0702083 A JP 8196282 A	20-03-1996 06-08-1996
WO 9400150	A	06-01-1994	CA 2117181 A AU 675204 B AU 2297292 A EP 0605432 A JP 6510799 T	06-01-1994 30-01-1997 24-01-1994 13-07-1994 01-12-1994
WO 9606638	A	07-03-1996	FR 2723849 A AU 3349095 A EP 0814835 A	01-03-1996 22-03-1996 07-01-1998
WO 9601321	A	18-01-1996	IT T0940543 A AU 2418895 A CA 2194135 A EP 0769057 A JP 10502253 T	02-01-1996 25-01-1996 18-01-1996 23-04-1997 03-03-1998
WO 9731117	A	28-08-1997	AU 1876397 A	10-09-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem a internationale No

PCT/FR 97/02285

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/38 C07K14/045 A61K39/25

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 39491 A (VIROGENETICS CORP) 12 décembre 1996 voir page 141, alinéa 4 - page 149, alinéa 1 voir page 171, alinéa 4 - alinéa 5; revendications	1-4, 7, 9, 13-15
X	DE 44 26 453 C (BIOTEST AG) 2 novembre 1995 voir colonne 2, ligne 7 - ligne 28; revendications; exemples	1, 7, 13-15
A	WO 94 00150 A (HOPE CITY ; PANDE HEMA (US); RIGGS ARTHUR D (US); ZAIA JOHN A (US)) 6 janvier 1994 voir revendications; exemples	1, 9
	--- -/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 mai 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/05/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem e Internationale No

PCT/FR 97/02285

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 06638 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS SA ; INST NAT SANTE RECH MED (FR); BETBEDER) 7 mars 1996 voir revendications; exemples ----	1,2,6,9
A	WO 96 01321 A (ABBOTT LAB ; LANDINI MARIA PAOLA (IT); RIPALTI ALESSANDRO (IT); MAI) 18 janvier 1996 voir revendications; exemples ----	1
P,A	WO 97 31117 A (UNIVERSITEIT MAASTRICHT ; BRUGGEMAN CATHARINA ANNA (BE); VINK CORNE) 28 août 1997 voir revendications; exemples -----	1,7-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e Internationale No

PCT/FR 97/02285

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9639491 A	12-12-1996	AU 6160196 A EP 0837928 A	24-12-1996 29-04-1998
DE 4426453 C	02-11-1995	EP 0702083 A JP 8196282 A	20-03-1996 06-08-1996
WO 9400150 A	06-01-1994	CA 2117181 A AU 675204 B AU 2297292 A EP 0605432 A JP 6510799 T	06-01-1994 30-01-1997 24-01-1994 13-07-1994 01-12-1994
WO 9606638 A	07-03-1996	FR 2723849 A AU 3349095 A EP 0814835 A	01-03-1996 22-03-1996 07-01-1998
WO 9601321 A	18-01-1996	IT T0940543 A AU 2418895 A CA 2194135 A EP 0769057 A JP 10502253 T	02-01-1996 25-01-1996 18-01-1996 23-04-1997 03-03-1998
WO 9731117 A	28-08-1997	AU 1876397 A	10-09-1997